Aus dem Hygienischen Institut der Universität Berlin

Stellv. Direktor: Prof. Dr. H. Zeiß
Abteilung: Prof. Dr. F. Weigmann

Die Wirkung menschlichen Speichels auf Diphtherie-Bacillen verschiedener Typenzugehörigkeit

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der
Medizinischen Doktorwürde
an der
Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Berlin

vorgelegt von

Alfred Koehn
Königsberg i. Pr.

Berlin, den 19. April 1938.

Buchdruckerei Otto Kandler, Beeskow (Mark)

M 29

Gedruckt mit Genehmigung
der
Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. Siebeck

Referent: Prof. Dr. Weigmann

Korreferent: Prof. Dr. Zeiß

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Die Wirkung menschlichen Speichels auf Diphtheriebacillen verschiedener Typenzugehörigkeit.

Nach Diphtherieerkrankungen verschwindet im allgemeinen der Löfflerbacillus in verhältnismäßig kurzer Zeit aus dem Nasen-Rachen-Raum; auch führen weitaus nicht alle festgestellten Infektionen zu einer Erkrankung und zu einem Weiterwuchern der Bakterien im N.-R.-Raum. Diese Tatsache ist insofern erstaunlich, als dort die günstigsten Kulturbedingungen für die Bacillen herrschen müßten. Man muß daher in den Schleimhäuten oder ihren Sekreten ein antibakterielles Agens annehmen. Daß die Schleimhäute und der Nasenschleim eine intensive bakterizide Wirkung haben, wird häufig mit Sicherheit angenommen (Van Riemsdijk, Hetsche, Bernhard, und Paneth u.a.)

Mehrere Autoren, die eine bakterizide Wirkung des Speichels bei Menschen und Tieren experimentell nachzuweisen suchten, kamen zu völlig verschiedenen Ergebnissen. Während Sanarelli, Florain und M. Bordet eine gewisse antibakterielle Wirkung, aber nur gegen Saprophyten, feststellten, konnten Hugenschmidt, Krüger, van der Reis, Seitz nichts derartiges nachweisen. Dold und Weigmann dagegen sahen bei ihren Versuchen bei einzelnen Personen eine ausgesprochene bakterizide und umwandelnde Wirkung auf virulente Diphtheriebacillen, während andere Personen diese Wirkung vermissen ließen.

Nach der Veröffentlichung dieser Versuche gewann das Problem der Diphtherietypen durch die Arbeiten englischer Autoren (Anderson, Happold, Mc. Leod, Thomsen), die in deutschen Instituten nachgeprüft und bestätigt wurden (Christison, Gundel und Tietz, Hetsche, Schiff und Werber, u.a.) erneut an Interesse.

Schon in der älteren Literatur über den „Diphtherieerreger" tauchen Versuche auf, die Löfflerbacillen mit ihren außerordentlich variablen Eigenschaften in enger charakterisierte Untergruppen aufzuteilen. Hierbei ging man von den verschiedensten Eigenschaften der Bakterien aus.

Die alte französische Schule teilt alle diphtheroiden Stäbchen, einschließlich der Pseudodiphtheriebacillen, nach ihrer Länge ein, ein Versuch, den auch Pesch in seiner späteren Einteilung unter Hinzunahme des unterschiedlichen Sauerstoffbedarfs und des Säurebildungsvermögens der Bakterien unternimmt. Die meisten Einteilungsversuche jedoch stützen sich auf Stäbchenform und die Art des Koloniewachstums. Schon Löffler und Neißer kannten drei verschiedene Kolonieformen, legten dieser Kenntnis jedoch keine Bedeutung bei, da die einzelnen Koloniearten nicht rein weiterzüchtbar waren. L. Zupnik beschreibt zwei Koloniearten, die allerdings oft nebeneinander bei der gleichen Kultur auftreten und aus gleichen Stäbchen bestehen. Baerthlein hält seine zwei (mit einem Zwischentyp) nach Kolonieform auf Glyzerin-Agar (Aussaat aus mehrwöchigen Bouillonkulturen), Stäbchenform und Wachstumsart in Bouillon differenzierten Typen für Mutationen, die aber rückwandelbar sind. Auch Bernhard und Paneth beobachteten auf alten Kulturen verschiedene Kolonieformen. Hammerschmidt differenziert bereits 1924 auf sogenanntem Hungeragar drei Typen nach Kolonieform, Bouillonwachstum und Hämolyse gegen Kaninchen- und Menschenblut. Typ A hat dichte, glatte, halbkuglige Kolonien, trübt gleichmäßig ohne Bodensatz die Bouillon und ist ausnahmslos hämolytisch. Typ B bildet den Uebergang zu Typ C, hat große Kolonien mit gezacktem Rand und dichtem Zentrum, in Bouillon befindet sich ein starker Bodensatz ohne nennenswerte Flüssigkeitstrübung. Die Hämolyse war nicht bei allen Stämmen deutlich. Typ C wächst zart, rundlich mit gekerbtem Rand, in Bouillon findet sich ein feiner Bodensatz ohne Flüssigkeitstrübung. Kein Stamm dieses Typs war hämolytisch. Die Typen wuchsen gleichartig trotz häufiger Ueberimpfungen und Tierpassagen weiter und waren auch serologisch trennbar. Alle von Patienten isolierten Stämme waren reine Typen oder setzten sich aus mehreren Typen zusammen, die trennbar waren. Aehnliche Kolonieformen beschreibt auch Kliewe auf Glyzerinagar, doch lehnt er einen Zusammenhang mit der Hämolyse ab, bestätigt vielmehr die Beobachtung Bernhard und Paneth's, daß die einzelnen Typen im Zusammenhang mit der Giftbildung und der Erkrankungsform stehen sollen. Auch M. Brückner bringt eine ähnliche Einteilung nach Lagerung, Viralenz, Säurebildung und Wachstumsform. Nach völlig

anderen Gesichtspunkten nimmt W. Lewinthal seine Einteilung vor, der von Einzelkulturen ausgehend die Löfflerbacillen nach ihren durch Schädigung hervorgerufenen Abwandlungsformen unterteilt.

Die englischen Forscher gingen dagegen bei ihrer Typeneinteilung im wesentlichen von klinischen Gesichtspunkten aus. Sie differenzierten auf einem Kochblut-Tellur Agar besonders häufig bei schweren, serumresistenten Diphtherieen mit Lähmungen und anderen Komplikationen einen Bacillentyp, dem sie die Bezeichnung Typus Gravis gaben. Er war bakteriologisch charakterisiert durch große, gezähnte Kolonien, die aus mittellangen, nicht immer Neisserpositiven Stäbchen bestanden. In Bouillon wuchsen die Bakterien mit Oberflächenhaut und krümeligem Bodensatz bei geringer Flüssigkeitstrübung. Sie waren imstande, Stärke, Traubenzucker, Dextrin und andere Zuckerarten zu spalten. Hämolyse war nachweisbar in Menschen- und Kaninchenblut, nicht aber in Rinderblut. Alkalisierung der sauren Bouillon trat innerhalb von 48 Stunden ein. Bei besonders leicht verlaufenden Diphtherieinfektionen wurde ein Typ isoliert, der glänzende, glattrandige Kolonien bildete, lange keulenförmige, immer Neisserpositive Stäbchen aufwies und nur Traubenzucker und Dextrin vergor, Stärke dagegen nicht zu spalten vermochte. In Bouillon trat eine gleichmäßige Trübung und Alkalisierung innerhalb von 3 bis 5 Tagen ein. Hämolisiert wurden alle drei Blutarten. Der Typ erhielt die Bezeichnung Mitis. Als dritter Typ wurde eine zwischen den beiden ersten liegende Rasse gefunden, sie erhielt den Namen Typus Intermedius. Die kurzen, fast kokkenförmigen Stäbchen bildeten kleine zarte Kolonien mit flachem und leicht gezacktem Rand. In Bouillon wuchsen sie mit feinem Bodensatz, feiner Trübung und selten mit Oberflächenhaut. Alkalisierung trat nicht ein, ebenso keine Stärkespaltung und Hämolyse. Nur Traubenzucker und Dextrin wurde auch hier vergoren.

Die Engländerin M. Christison führte dann in Berlin entsprechende Untersuchungen aus, und konnte auch hier alle drei Typen feststellen. Die Nachprüfung durch Schiff und Werber, die nach Stärkevergärung, Hämolyse und Koloniewachstum auf Ascites-Agar (das Bouillonwachstum fanden sie nicht typisch) differenzierten, führte zu

denselben Resultaten. Auch Gundel und Tietz isolierten bei ihrer Nachprüfung der englischen Arbeiten nur nach dem Wachstum auf verschiedenen Nährböden und nach der Hämolyse, ohne Rücksicht auf Stärkespaltung und Bouillonwachstum die Typen I bis III (I = Gravis, II = Mitis, III = Intermedius). Nachdem Hammerschmidt seinen Typ A mit dem Mitis, Typ B mit dem Gravis und Typ C mit dem Intermedius indentifiziert hat, ist mit Ausnahme der Typen H. O. Hettche's in der Typenliteratur in nomenklatorischer Hinsicht eine gewisse Einheitlichkeit erzielt. Hettche teilt die Diphtheriebacillen mit Einschluß der Pseudodiphtheriebacillen nach ihrer Säurebildung in Saccharosebouillon in sechs Gruppen mit zwei Hauptgruppen ein. Dabei entspricht nach der Koloniebildung etwa die Gruppe 1 dem Typus Gravis, die Gruppe 2 dem Typus Mitis, während der Typus Intermedius zu der „hypaciden" Gruppe gehören würde, die aber auch Pseudodiphtheriebacillen umfaßt. In Bezug auf die Konstanz der Typen und ihr klinisches Bild bei Erkrankungen bestehen auch in der neueren Literatur verschiedene Ansichten, auf die später eingegangen werden soll.

Für uns erhob sich nun die Frage, ob das verschiedenenklinische Bild, das durch die einzelnen Typen hervorgerufen werden sollte, vielleicht in einer unterschiedlichen Widerstandskraft der Bakterien gegen die antibakteriellen Einwirkungen des menschlichen Speichels seine Erklärung finden könnte.

Eigene Versuche:

Zu den Versuchen, die zur Klärung dieser Frage angestellt wurden, kamen **Speichel** von **sieben Versuchspersonen** zur Verwendung. Die **Diphtheriebacillenstämme,** die der Einwirkung dieser Speichel ausgesetzt wurden, waren **aus frischen Abstrichen isoliert** und **nach** dem **Wachstum** auf Blut-Cystin-Agar*) **nach Typen getrennt.** Als zweites Unterscheidungsmerkmal der Typen wurde ihre unterschiedliche **Säurebildung** in 0,01% Cystinbouillon **mit** Zusätzen von 1% **Traubenzucker, Dextrin** oder **Stärke** verwandt. Nach der Koloniebildung soll also der Typus Gravis üppig, aber rauh und mit gezacktem Rasenrand wachsen. Die Einzelkolonie soll einen gezähnten Rand haben,

*) Blut-Cystin-Agar nach Gundel und Tietz.
2,5% Nähragar, 0,01% Cystin, 5 bis 8% Hammelblut.

einen Knopf in der Mitte und Radiärstrahlung aufweisen, sogenannte „Gänseblümchenform". Der Typus Mitis soll üppig und schleimig, spiegelnd mit scharfem Rand in Rasen und Einzelkolonie wachsen. Der Typus Intermedius zeichnet sich durch schwaches, farbloses Wachstum aus. In der Säurebildung unterscheidet sich der Gravis von den anderen beiden Typen durch das Vermögen, außer Traubenzucker und Dextrin, auch Stärke zu spalten. Pseudo-Di.Bacillen spalten keines dieser Kohlehydrate; über ihr Wachstum auf der Blut-Cystin-Platte liegen keine Beobachtungen vor.

Versuchsanordnung.

Von den Stämmen, die nach mehrmaliger Prüfung sowohl nach Wachstum wie nach Zuckervergärung einwandfrei einem Typus zuzuzählen waren, wurde von einer 24 stündigen Löffler-Serum- oder Blut-Cystin-Agar Kultur eine Oese in zwei Kubikcentimeter physiol. Kochsalzlösung aufgeschwemmt, und von dieser Aufschwemmung 0,1 ccm zu einem Kubikcentimeter Speichel hinzugefügt. Als Kontrolle für die Wuchskraft der Stämme wurde 1 ccm physiol. NaCl Lösung in gleicher Weise mit der Aufschwemmung beimpft, und um sicher zu gehen, daß in die Röhrchen wirklich lebensfähige Bakterien gelangt waren, aus allen Röhrchen Sofortaussaaten auf einen festen Nährboden gemacht. Verwendet wurde hierzu der Blut-Glycerin-Tellur-Nährboden von K. W. Clauberg (Clauberg II.), der das Wachstum der Diphtheriebacillen fördert, das der Begleitbakterien dagegen hemmt. Der verwandte Speichel wurde beimpft gleichfalls auf dieser Platte ausgestrichen und auf die Abwesenheit von diphtherieähnlichen Bakterien geprüft. Die beimpften Röhrchen wurden nun bei 37° bebrütet, und nach 18 und 40 Stunden Aussaaten aus ihnen auf Clauberg II gemacht. Nach 2 bis 4 tägiger Bebrütung dieser Platten wurde die Zahl der gewachsenen Di.-Kolonien mit + bis ++++ protokolliert. Sämtliche Kulturen wurden durch mikroskopische Präparate, die nach Gram und Neißer gefärbt waren, auf die Anwesenheit von Di.-Bacillen geprüft. Als es sich bei den ersten Versuchsreihen herausstellte, daß eine Schädigung der Bakterien auch in den Kochsalzkontrollen, vielleicht durch Hungerwirkung zu beobachten war (Tab. I.), wurde 1 ccm der Aufschwemmungslösung durch 1 ccm gewöhnliche Nährbouillon

ersetzt, sodaß also zu 1 ccm Speichel oder Kochsalzlösung 0,1 ccm Bakterienaufschwemmung in verdünnter Bouillon zugesetzt wurde. Als zweite Kontrolle wurde dann noch 1 ccm einmal aufgekochter Speichel beimpft, der nach Dold und Weigmann keinerlei antibakterielle Wirkung mehr haben sollte. Diese Beobachtung konnte auch hier bestätigt werden.

Versuchsergebnisse.

Tabelle I sei als Beispiel einer Versuchsreihe angeführt. Danach konnte bei den Personen Mo. und W. eine deutliche, das Wachstum der

Tabelle 1.

	Di. 6326 Gravis		Di. 6646 Mitis		Di. 5830 Intermedius		Sp. unbeimpft	
	0 Std.	18 Std.	0 Std.	18 Std.	0 Std.	18 Std.	0 Std.	18 Std.
Mi.	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	0	0
Mo.	+ + + +	+ +	+ + + +	0	+ + + +	0	0	0
W.	+ + + +	+ +	+ + + +	0	+ + + +	0	0	0
NaCl	+ + + +	+	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ +		

Mi., Mo., W.-Versuchsspeichel, denen drei typenverschiedenen Di. Stämme ausgesetzt werden. Sp. unbeimpft - Kontrollaussaat der unbeimpften Speichel um das Vorhandensein diphtheroider Keime auszuschliessen. NaCl - Stammkontrolle in physiol. NaCl-Lösung.

Bakterien hemmende Wirkung im Speichel festgestellt werden, während der Speichel Mi. keinerlei Wirkung hatte. Das kräftige Wachstum im Sp. Mi. beweist in dieser Versuchsreihe trotz der ausgefallenen Kochsalzkontrolle die Lebensfähigkeit der verwendeten Bakterien. Die antibakterielle Wirkung war nach dem Gesamtresultat aller angestellten Versuchsreihen bei allen drei Diphtherietypen gleich stark. Es ergab sich also nicht, wie es nach Tabelle 1 zunächst erscheint, eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Typen gegenüber den antibakteriellen Kräften in menschlichen Speichel. (Bereits von Professor Fr. Weigmann in der Diskussion während der Mikrobiologentagung in Berlin im Mai 1935 mitgeteilt). Eine Einschränkung hierzu ist höchstens insofern zu machen, als weniger kräftige Stämme, die auch anderen Umwelteinflüssen gegenüber empfindlicher waren, durch die Einwirkung des Speichels stärker geschädigt wurden; da Di.-Bacillen des Typus Intermedius schon durch ein schwaches Wachstum charakterisiert sind, und bei Stämmen des Typus Mitis besonders häufig eine recht große

Empfindlichkeit gegenüber ungünstigeren Nährbodenverhältnissen (z.B. schon Schwankungen in der Güte des Löfflerserums) beobachtet werden konnte, war in vielen Versuchsreihen eine größere Hemmung dieser Typen sichtbar. Kräftige Mitis- und Intermedius-Stämme jedoch wurden weniger geschädigt, als weniger kräftige Gravisstämme. (s. h. Tabelle 3).

Hinsichtlich der Stärke der Wirksamkeit bei den Speichelproben verschiedener Versuchspersonen konnte, wie bei Dold und Weigmann, festgestellt werden, daß der Speichel einiger Personen, hier z. B. der von Mi. fast niemals eine Wirkung hatte, bei anderen Personen dagegen war eine sehr starke Schädigung der Bakterien zu beobachten (Speichel P. und N.). Die Wirksamkeit der übrigen Versuchsspeichel ergab Mittelwerte zwischen diesen beiden Extremen. Derartige Schwankungen der Speichelwirkung sah man aber nicht nur zwischen den Speicheln verschiedener Personen, sondern die traten im Verlaufe der Versuche über eine längere Zeit auch bei dem Speichel ein und derselben Person auf. Ohne eine Erklärung für diese Tatsache geben zu wollen, sei die Beobachtung mitgeteilt, daß zu Zeiten, in denen Erkältungen gehäuft

Tabelle 2.

19. 8. 35.	Gravis 15 c			(Gravis) 13 a			Mitis 33		
Sp. Einw.	0 Std.	18 Std.	40 Std.	0 Std.	18 Std.	40 Std.	0 Std.	18 Std	40 Std.
K.	+ + + +	+ + + +	0	+ + + +	+ + + +	+	+ + + +	+ + + +	0
N.	+ + + +	+ + +	0	+ + + +	+	0	+ + + +	0	0
NaCl-B.	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
6. 9. 35.	(Gravis) 15 e			Gravis 13			(Mitis) 33 b		
K.	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
N.	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
NaCl-B.	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
20. 9. 35.	Gravis 17			Gravis 13			Intermed. 24		
K.	+ + + +	+ +	+	+ + + +	+ +	+ +	+ + + +	+ +	+ +
N.	+ + + +	+ + + +	+ + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ +	+ +
NaCl-B.	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +

Drei Versuchsreihen über Speicheleinwirkung mit filtriertem Speichel der Versuchspersonen K. und N. NaCl-B. - Stammkontrolle in Kochsalz-Bouillion. Verschiedene Di. Stämme unterschiedlicher Typenzugehörigkeit. ( ) - aus dem Ursprungsstamm gewonnene pseudodi.-artige Abwandlungsstämme.

Reihe vom 19. 8. gibt normales Wirkungsverhältnis der beiden Versuchsspeichel wieder. Reihe vom 6. 9.: völlige Unwirksamkeit beider Speichel zu einer Zeit häufiger Erkältungen. Reihe vom 20. 9 : auffallende Wirksamkeitsverminderung des Speichels N. gegenüber K. bei Erkältung von N.

auftraten, die antibakterielle Wirkung aller Versuchsspeichel zum Teil bis auf Null herabging. (s. h. Tabelle 2, 2. Versuchsreihe). Sofort angestellte Kontrollversuche mit anderen Stämmen und anderen Nährböden hatten dieselben Resultate, die Erscheinung beruhte also nicht auf einer besonderen Resistenz der verwendeten Stämme. Zweimal konnte außerdem beobachtet werden, daß bei Erkältung einer Versuchsperson die Wirkung ihres Speichels fast ganz aufhörte, während die Speichelwirkung anderer Personen in ihrem früheren Ausmaße erhalten blieb. Als Erläuterung hierzu möge die Tabelle 2 dienen, die einen Ausschnitt aus den Versuchsprotokollen aus der Zeit darstellt, in der diese Beobachtungen gemacht wurden. Die Versuchsreihe vom 19. 8. gibt in Bezug auf die Stärke der wachstumshemmenden Wirksamkeit der beiden Versuchsspeichel K. und N. das in den meisten Versuchen beobachtete normale Verhältnis wieder. D. h., daß der Speichel N. normalerweise eine viel stärkere und schnellere hemmende Wirkung zeigt, als der Speichel K. Zur Zeit der Versuchsreihe vom 6. 9. traten Erkältungskrankheiten gehäuft auf; von den beiden Versuchspersonen war zu dieser Zeit keine erkrankt, beider Speichel jedoch hatte keinerlei antibakterielle Wirkung mehr, und die Mundflora war bei beiden erheblich vermehrt. Bei der Anstellung der Versuchsreihe vom 20. 9. war die Versuchsperson N. erkältet (Schnupfen). Auffallend ist die geringe Wirkung ihres Speichels, während der sonst schwächer wirkende Speichel K. seine normale Wirksamkeit aufweist. Wie gesagt können diese Schwankungen nicht durch Eigenarten der verwendeten Stämme hervorgerufen sein, da Kontrollversuche mit ganz frisch isolierten Di.-Stämmen die gleichen Resultate hatten, sie müssen also ihre Begründung in einem zeitlichen Verlust der antibakteriellen Wirksamkeit des Speichels finden. Ergänzend mag zu der Tabelle 2 noch erwähnt werden, daß bei der Versuchsreihe vom 20. 9. neben der Hemmungswirkung bei den Stämmen 17 und 24 durch den Speichel K. eine später zu beschreibende Umwandlungswirkung zu beobachten war.

Nachdem K. W. Clauberg in einer Arbeit, in der er die Versuchsergebnisse von Dold und Weigmann nachprüfte und im wesentlichen bestätigte, festgestellt hatte, daß eine bakterizide Wirkung auch

im Speichelfiltrat (Seitz-Ueberdruckfilter) zu beobachten ist, wurden ebenfalls Versuche mit filtriertem Speichel angestellt. Die Verwendung von Speichelfiltrat erschien insofern von Vorteil, als man den vielleicht wirksamen Bakterienantagonismus der normalen Mundflora ausschalten, und die Wirkung des reinen Speichelsekrets prüfen konnte. Außerdem war es so möglich, jeden Speichel zu verwenden und die Versuchsergebnisse ohne Rücksicht auf etwa doch im natürlichen Speichel vorhandene diphtheriode Bakterien auszuwerten. Andererseits war die Gefahr zu berücksichtigen, daß durch die Filtration mit dem Mucin auch die wirksamen Körper abfiltriert, beziehungsweise adsorbiert würden, und daß eine Schädigung der Bakterien durch das Filtrat nicht auf einer spezifischen, sondern auf einer allgemeinen Hungerwirkung des jetzt bedeutend verschlechterten Nährbodens beruhen könnte. So konnten Dold und Weigmann keine antibakterielle Wirkung des Speichelsfiltrats feststellen. Sie filtrierten allerdings im Unterdruckfilter, und es wäre denkbar, daß dabei die wirksamen Körper entweder nicht durch das Filter mit durchgesaugt, oder durch die zu lange andauernde Filtration adsorbiert wurden.

Bei den hier angestellten Versuchen war die Anordnung die gleiche, wie bei den früheren Versuchen. Die Filtration geschah wie bei Clauberg im Seitz-Ueberdruck-Filter mit Asbesteinlage. Der Ueberdruck wurde durch Anschluß an eine Stickstoffbombe hergestellt, er betrug 2 bis 2½ Atmosphären. Die Filtration von etwa 10 ccm Filtrat war in 5 bis 10 Minuten beendet.

Es ergab sich, wie aus der folgenden Tabelle 3 ersichtlich ist, daß bei der hier angeführten Versuchsperson P. allenfalls eine ganz unwesentliche Verminderung in der Wirkung in Filtrat gegenüber dem unfiltrierten Speichel feststellbar war, während die Versuchsperson K. in diesem Versuch überhaupt keine Wirkung ihres Speichels aufwies.

Auch im Filtrat wurde die Wirkung nicht durch den Bouillonzusatz der Aufschwemmung, wohl aber durch Aufkochen aufgehoben.

Bei der Frage nach der Art der Wirkungsweise kann man wohl eine reine Hungerschädigung im Speichel oder im Filtrat ausschließen, denn

Tabelle 3.

Sp. Einw.	Gravis 15			Mitis 36			Intermed. 64		
	0 Std.	18 Std.	40 Std.	0 Std.	18 Std.	40 Std.	0 Std.	18 Std.	40 Std.
P. filtriert	+ + + +	+	0	+ + + +	+ +	+	+ + + +	+	+
unfiltriert	+ + + +	0	0	+ + + +	+	+	+ + + +	+	+
K. filtriert	+ + + +	+ + + +	+ +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ +
unfiltriert	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
NaCl-B.	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	0

Speichelkontrollaussaaten: auf Clauberg II unfiltr Sp.: Keine Diphtheriebakterien. Auf Blutagar filtr. Sp.: Aussaat steril.

Versuch mit filtriertem und unfiltriertem Speichel der Versuchspersonen P. und K. Speicheleinwirkung auf drei typenverschiedene Diphtheriestämme. NaCl-B. = Stammkontrolle in physiol. NaCl-Lösung mit Nährbouillonzusatz.

Keine wesentliche Aenderung der Speichelwirksamkeit durch die Filtration im Seitz-Filter.

der Bouillonzusatz müßte für die Ernährung der Bakterien während der Zeit der Bebrütung genügen, wie es ja auch aus dem guten Wachstum in der Kochsalz-Bouillon-Kontrolle hervorgeht. Außerdem trat in den unwirksamen Speicheln und gleichfalls ihren Filtraten, wie auch im gekochten Speichel und Speichelfiltrat nicht nur keine Schädigung, sondern sogar eine deutliche Anreicherung der Diphtheriebacillen ein. Die Klärung der Frage, welche Beschaffenheit das antibakterielle Agens habe, ob es, nach Dold's Meinung, ein nicht hitzebeständiger, eiweißartiger Antikörper, oder, wie Clauberg meint, das im Speichel vorhandene Rhodankalium ist, lag nicht im Rahmen dieser Versuche. Jedenfalls ist die Tatsache, daß die Speichelwirkung durch Kochen und Inaktivieren bei 56° (Dold und Weigmann) verloren geht, schwer mit Claubergs Ansicht vereinbar, da es nicht zu verstehen ist, wie dabei das etwa wirksame mineralische Rhodankalium seine Wirksamkeit einbüßen sollte. Andererseits ist der Einwand gegen die Ansicht Dold's, der von Clauberg auf Grund dessen gemacht wurde, daß die Wirksamkeit des Speichels im Filtrat nicht aufgehoben ist, deshalb nicht stichhaltig, weil Clauberg von der Annahme ausgeht, daß sich in dem Filtrat nur noch Salze und keine Eiweißkörper mehr befinden könnten. Es ließen sich aber nach dem Eindampfen im Exsiccator Eiweiß und Ptyalin im Speichelfiltrat nachweisen.

Nachdem die Beobachtung des beimpften Speichels über längere Zeit ausgedehnt wurde (bis 160 Stunden), stellte es sich heraus, daß nach einem gewissen Minimum in der Koloniezahl bei etwa 18 bis 40 Stunden

Bebrütung das Wachstum wieder merklich üppiger wurde. Ein Beispiel hierfür sei Tabelle 4.

Tabelle 4.

	Gravis 15 I und 15 III				
Sp. Einw.	0 Std.	18 Std.	40 Std	64 Std.	160 Std.
P.	+ + + +	+ +	+	+ +	+ + +
NaCl-B	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
Sp. Kontrolle	In der Aussaat des unbeimpften Speichels auf Clauberg II keine Di-ähnlichen Bakterien.				

Ueber längere Zeit ausgedehnte Speicheleinwirkung durch den Speichel der Versuchsperson P. auf zwei Einzelkulturen des Gravisstammes 15. NaCl-B - Stammkontrolle in Kochsalzbouillon Erneutes Ansteigen der Keimzahl im beimpften Speichel nach Aufhören der antibakteriellen Wirkung.

Diese Wachstumshemmung aller eingesäten Keime ließ sich aber nicht nur bei der beimpften Speichelprobe durch Ab- und erneute Zunahme der Koloniezahl in den hintereinander folgenden Aussaaten feststellen, vielmehr konnte sie fast noch deutlicher und eindrucksvoller bei der Entwicklung des Wachstums auf der einzelnen Platte bei der Aussaat 18 bis 40stündiger (stärkste Schädigung, s. h. Tab. 4) Speicheleinwirkung auf die Bakterien beobachtet werden. Wenn man die Aussaaten aus dem gerade beimpften Speichel, den länger bebrüteten NaCl-Bouillon-Kontrollen und unwirksamen Speicheln nach 24stündiger Bebrütung bei 37° besichtigte, so zeigte sich ein kräftiges Wachstum auf der Platte, das sich nach längerer Bebrütung kaum vermehrte. Bei den Aussaaten aus den wirksamen und 18 bis 64 Stunden lang nach der Beimpfung bebrüteten Speichelproben dagegen wuchsen nach 24stünd. Bebrütung der Platte oft nur wenige Kolonien, oder die Platte schien steril zu sein, nach 2 bis 4tägigem Aufenthalt im Brutschrank aber wuchsen in sehr vielen Fällen noch viele Kolonien oder sogar Rasen nach.

Diese Tatsachen lassen sich vielleicht so erklären, daß das antibakterielle Agens seine Wirksamkeit nach einer gewissen Zeit einbüßt, und daß dann in den Speichelproben nur gehemmte und noch nicht abgetötete Keime in dem an und für sich nicht ungünstigen Nährsubstrat erneut zu wuchern beginnen, und daß diese Hemmung der Wachstumstendenz bei geschädigten aber noch nicht abgetöteten Bakterien in der notwendigen längeren Bebrütungszeit der Aussaaten zum Ausdruck kommt.

Eine Ergänzung erfährt dieses rein experimentelle Ergebnis durch eine Arbeit von Braun, der feststellt, daß bei Aussaaten der Abstriche von Bacillenträgern im Untersuchungsamt die Platte nach 24stündiger Bebrütung noch kein Diphtheriewachstum zeigt, daß dagegen in Gegensatz zu Krankenabstrichen (keine Schädigung durch Abwehr im Organismus) noch recht häufig nach 48stündiger Bebrütung Kolonien von Löfflerbacillen auftreten. Schmitz, Bernhard und Paneth, Killian und Gräf beobachteten das Gleiche bei geschädigten und degenerierten Stämmen.

Die festgestellte Wachstumshemmung wird nicht etwa vorgetäuscht durch eine Zusammenklumpung und dadurch bewirkte ungleichmäßige Verteilung an sich lebensfähiger Bakterien, sondern es muß eine direkte Schädigung des einzelnen Keimes vorliegen. Wenn man nämlich bei jeder Aussaat gleichzeitig einen Tropfen aus den beimpften und bebrüteten Speichelproben und aus den Kontrollen entnahm und auf dem Objektträger antrocknen ließ, so zeigte sich bei der Besichtigung des nach Gram gefärbten Präparates, daß in allen Fällen die Verteilung der Keime gleich gut war. Auch bei den Speichelproben, deren Aussaat ein stark reduziertes, oder gar kein Wachstum zeigte, konnte auf diese Weise irgend ein Hinweis auf eine Zusammenklumpung der Keime nicht gefunden werden; dagegen war in diesen Fällen meist ein feiner Bakteriendetritus und besonders viele aufgequollene Involutionsformen zu beobachten. Auch in dieser Beziehung konnte ein Unterschied zwischen den einzelnen Typen nicht gesehen werden.

Es tritt also im Speichel und in seinem Filtrat, sofern überhaupt eine Wirkung auf die eingeimpften Diphtheriebacillen sichtbar ist, zunächst eine Wachstumshemmung aller oder der überwiegenden Zahl der Keime ein; dann erst erfolgt eine Abtötung, wohl der am wenigsten widerstandsfähigen Bakterien, und darauf nach dem Aufhören der antibakteriellen Wirkung ein erneutes Wuchern etwa noch vorhandener überlebender Keime. Diese sind entweder besonders kräftig wachsende Bakterien des ursprünglich der Speicheleinwirkung ausgesetzten Stammes, und zeigen seine Typeneigenschaften noch sehr deutlich, oder man kann an ihnen die mehr oder minder starke Einwirkung der zweiten antibakteriellen Wirkungsweise des Speichels beobachten,

nämlich der Umwandlung in atypische oder den Pseudodiphtheriebacillen gleichende Degenerationsformen. Diese beiden Wirkungen, die hemmende und umwandelnde, laufen nicht etwa parallel, vielmehr zeigten z. B. die Versuchsspeichel P. und N. eine besonders deutliche und meist kräftige Hemmungswirkung, während der Versuchsspeichel K. eine bei seiner sehr geringen Hemmungswirkung auffallend starke Umwandlungswirkung aufwies.

Umwandlung.

Im Verlaufe der oben beschriebenen Versuche über die antibakterielle Wirkung des Speichels auf Diphtheriebacillen, die eine Fortsetzung der Arbeiten von Dold und Weigmann mit Hinzunahme des Typenproblems waren, stellte sich bei der Rückübertragung der geschädigten Bakterien auf Blut-Cystin-Agar zuweilen eine Veränderung in der Art des Wachstums ein. Dold und Weigmann hatten seinerzeit unter Speicheleinwirkung eine Umwandlung eines echten Di.-Stammes in Pseudo-Di-Bacillen beobachtet, allerdings hatten sie, um exakter arbeiten zu können, bei ihren Umwandlungsversuchen mit einem festen Speichelnährboden gearbeitet. Dadurch, daß es sich bei den vorhin beschriebenen Versuchen herausgestellt hatte, daß die Wirksamkeit des Speichels durch eine Filtration nicht wesentlich beeinflußt wird, war es möglich, auch im flüssigen Speichelfiltrat exakte Versuchsbedingungen zu schaffen, und so die Bakterien einer vielleicht intensiveren und gleichmäßigeren Einwirkung im flüssigen Nährboden auszusetzen. Man konnte in dem auf seine Keimfreiheit jedesmal durch Aussaat auf Blut-Agar geprüften Filtrat ein Vorhandensein von nicht eingeimpften Keimen, besonders von Pseudodiphtherie-Keimen, mit Sicherheit ausschließen.

Versuchsanordnung.

Die Versuchsanordnung war im wesentlichen die gleiche, wie in den früheren Versuchen. Die Aufschwemmung der Keime wurde auch hier mit physiol. NaCl-Lösung und Bouillon im Verhältnis 1 : 1 hergestellt. Ein Kubikcentimeter frisches Speichelfiltrat wurde dann mit 0,1 ccm der Aufschwemmung beimpft. Als Kontrollen dienten wiederum

1 ccm Kochsalz-Bouillon und 1 ccm aufgekochtes Speichelfiltrat, die in gleicher Weise beimpft wurden. Bebrütung und Aussaat wurden wie bei den früheren Versuchen gehandhabt. Von den auf Clauberg II gewachsenen Kolonien wurden nun jedesmal Aussaaten auf Blut-Cystin-Agar (BCA) gemacht, um etwa auftretende Wachstumsänderungen feststellen zu können. Später wurde das bebrütete Filtrat direkt auf BCA ausgestrichen, da der Verdacht auftauchte, daß die Umwandlung auf dem Wege einer Abspaltung vor sich gehen könnte, und die hierbei nebeneinander wachsenden Kolonien des Ursprungstyps und des neu auftretenden Typs auf der Claubergplatte nicht zu unterscheiden waren. Der seinem Wachstum nach am meisten veränderte aus dem bebrüteten Speichel herausgezüchtete Stamm wurde dann auch auf seine übrigen Eigenschaften im Vergleich mit den aus den Kontrollen herausgezüchteten Stämmen geprüft, und dann als neuer Versuchsstamm erneut der Speichelwirkung unter den gleichen Bedingungen ausgesetzt. Die zu den Umwandlungsversuchen verwendeten Ursprungsstämme waren nach den oben angegebenen Unterscheidungsmerkmalen einwandfrei einem der drei Typen zuzuzählen und zeigten kräftiges Wachstum. Es waren von ihnen nach dem Isolierverfahren von Koblmüller und Vierthaler (auf festem Nährboden) **Einzellkulturen** hergestellt, die nochmals mehrfach auf ihre Typenzugehörigkeit geprüft waren. Auf diese Weise wurden 5 Diphtheriestämme und zwar 3 Gravisstämme, 1 Intermedius- und 1 Mitisstamm, außerdem als Kontrolle noch ein Pseudodiphtheriestamm vom Hoffmanntyp näher untersucht.

Versuchsergebnisse.

Gravis. Von den drei Gravisstämmen stammen die
Stämme 13 (Einzellkultur von Di. 10302) und
15 (Einzellkultur von Di. 10510) von Bacillenträgern, der
Stamm 17 (Einzellkultur von Di. 11073) aus dem Abstrich eines Krankheitsfalles zu Krankheitsbeginn. Alle drei zeigten sie typisches Gravis wachstum mit schönen „Gänseblümchenformen", sie spalteten Stärke, Dextrin und Traubenzucker, wuchsen auf der Cystinbouillon mit kräftigem Oberflächenhäutchen. Eine Oese von einer 24 stündigen Löfflerserumkultur tötete bei subcutaner Impfung Meerschweinchen in

24 bis 72 Stunden unter den typischen Zeichen des Diphtherietodes. Alle drei Stämme wuchsen gut anaerob im tiefen Agarstich. Die Form war im nach Gram gefärbten Ausstrichpräparat von 24 stünd. Löffler-kulturen bei 13 und 15 mittellang bis kurz, bei 17 etwas länger und schlanker. Die Gram-Färbbarkeit war gut, die PK-Färbung nach Neißer meist vorhanden. Es waren viele V-Formen zu beobachten. Von dem in der Ausbildung der typischen Graviskolonieform besonders schönen Stamm 13 zeigt die Abbildung 1 Fotografien von Einzelkolonien und die dazugehörigen Mikrofotogramme. (St. 17 f. h. Abb. 2).

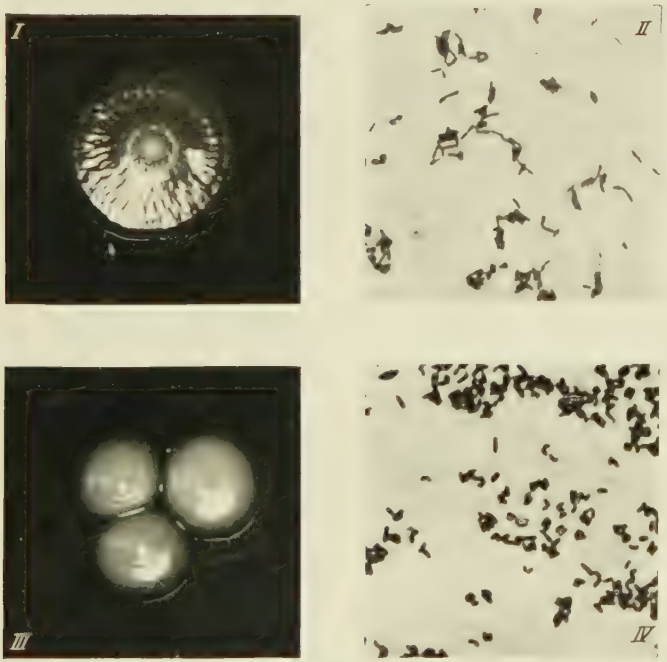

Abb. 1. Gravis. Einzellkultur 13

I u. II Ursprungsstamm. III u. IV Umwandlungsstamm nach 3 maliger Speichelpassage

Kolonien: 48 stündige Kultur auf Blut-Cystin-Agar 10 fach vergrößert Mikrofotogramme nach Gram gefärbte Ausstrichpräparate von 24 stünd Löfflerserumkulturen 1000 fach vergrößert

Bei der Speicheleinwirkung zeigten die Stämme recht verschiedenes Verhalten. Bei Stamm 13 (Abb. 1) trat ebenso wie bei Stamm 17 (Abb. 2) sehr schnell eine deutliche Umwandlung ein. Bereits nach der ersten Speichelpassage waren die eingesäten Keime der beiden Versuchsstämme weitgehend verändert. Bei Stamm 13 wuchsen nach 18 stündiger Einwirkung des Versuchsspeichels P. bei gleichzeitiger starker allgemeiner Wachstumshemmung auf der Clauberg II Platte einzelne schwarze Kolonien mit grauem, leicht glasigem Rand, so wie H. O. Hettche Pseudodi.-Bacillen aus Nasen- und Rekonvalescentenabstrichen beschreibt. Auch hinsichtlich des Wachstums auf BCA (Abb. 1 III). (Rasen und Kolonie glatt, s. h. spätere Beschreibung des Pseudodi.-Wachstums, üppig und gelblich, schleimig auf Löfflerserum), der Zuckervergärung (Stärke, Dextrin, Traubenzucker O), des Gedeihens im tiefen Agarstich (O) und der Meerschweinchenpathogenität (O) verhielten die weitergezüchteten Bakterien sich völlig wie Hoffmannbacillen. Die Form der einzelnen Bakterien war auf BCA völlig rund, auf Löfflerserum und Clauberg II dagegen zeigten sich ganz gleichgroße, spindelförmige plumpe Stäbchen (Abb. 1 IV). Die Gramfärbung war stark positiv, die Neißerfärbung negativ. Spätere Speichelpassagen und Weiterimpfungen (etwa 20 bis 25) brachten keinerlei weitere Aenderungen. (Die Abb. 1 III und IV zeigt Fotografien nach der dritten Speichelpassage). Bei Stamm 17 (Abb. 2) zeigte sich nach 40stünd. Einwirkung des Speichels K. (Tabelle 2) ohne sehr starke Wachstumshemmung im Gesamtwachstum auf der Platte (Die · · bezeichnen die gewachsenen Kolonien des Ursprungstyps in der Tabelle) neben 2 Kolonien vom Typ des Ursprungsstammes ein dichter zarter Rasen mit glattem Rand und von fast völliger Farblosigkeit. (Abb. 2 III). Er bestand aus mittellangen gram- und neißerpositiven ziemlich schlanken Di-Stäbchen (Abb. 2 IV). Diese zeigten Säurebildung nur in Traubenzuckerbouillon, Stärke und Dextrin wurden nicht vergoren. Das anaerobe Wachstum war fraglich, die Tierpathogenität positiv. Nach der nächsten Speichelpassage war keinerlei weitere Aenderung zu beobachten, erst nach der dritten Passage (St. 17c. Die Abwandlungsstämme wurden der Reihe nach mit a, b, c, . . . bezeichnet) verschwand die Säurebildung auch in der Traubenzuckerbouillon, und die Stäbchen wurden kurz und spindelförmig, das

Wachstum aber blieb immer noch zart und farblos, oft zeigten sich erst nach 48stündiger Bebrütung der Aussaaten gut sichtbare Kolonien mit glatten Rändern. Nach der vierten Speichelpassage wachsen in dem

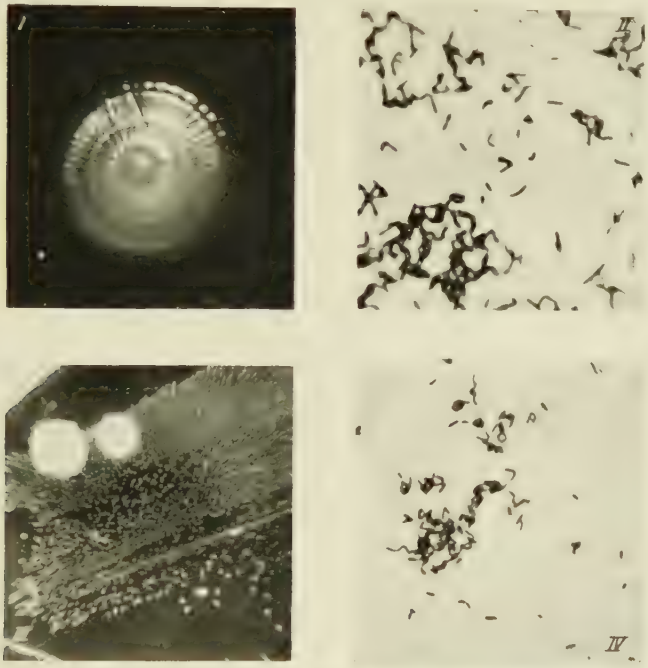

Abb. 2. Gravis. Einzelkultur 17.
I u. II Ursprungsstamm. III (nur 3fach vergrößert) neben zwei Kolonien vom Ursprungstyp, Rasen des Stammes 17a nach einer Speichelpassage. IV Ausstrichpräp. des zarten Rasens von III. Fotografie wie bei Abb. 1.

feinen Rasen einzelne große glatte Kolonien wie bei Stamm 13c, deren einzelne Bakterien ebenfalls kurz, plump und pallisadenförmig gelagert waren und keine PK aufwiesen. Sie wuchsen nicht anaerob, bildeten weder in Stärke und Dextrin, noch auch in Traubenzucker-bouillon Säure, und waren nicht tierpathogen. Nach 5maliger Ueberimpfung traten keine Aenderungen in diesen Eigenschaften ein.

Viel langsamer, als bei diesen beiden Gravisstämmen traten Typenänderungen bei dem Gravisstamm 15 auf. Hier war nach drei hintereinanderfolgenden Speichelpassagen (St. 15 bis 15c) eine wesentliche Umwandlung noch nicht festzustellen. Zwar wurde der Rasen glatter und weißer, und das Oberflächenhäutchen auf der Cystinbouillon kam bei St. 15c nicht mehr zur Ausbildung, doch konnte man erst nach der vierten Passage (St. 15 d) von einer deutlichen Umwandlung sprechen. Das Wachstum auf BCA war fein und zart mit glattem Rasenrand, die grampositiven Stäbchen fast kokkenförmig mit teilweiser Neißerfärbung. Säurebildung trat nicht mehr in Stärke-, sondern nur noch in Traubenzucker- und Dextrinbouillon ein. Anaerobes Wachstum war kaum mehr vorhanden, im Tierversuch erwies sich jedoch der Stamm wiederholt als pathogen. Er wurde über 14 Tage zunächst unverändert weitergezüchtet, ging dann aber verloren. Nach der nächsten Speichelpassage (St. 15e) war das Wachstum sehr üppig, Rasen und Einzelkolonien schleimig glänzend (wie 13c Abb. 1 III) der Rand glatt, und im Ausstrichpräparat zeigten sich wie bei 13c ganz kurze, gleichförmige spindelige, häufig in Palisadenform gelagerte oder zusammengeklumpte Stäbchen. (Kolonien von 15e in Abb. 5 II). Die Gramfärbung war stark positiv, die PK Färbung gleichmäßig negativ. Das ganze Bild war typisch für Pseudodiphtherie-Bacillen vom Hoffmanntyp. Anaerobes Wachstum und Säurebildung in Traubenzucker-, Dextrin- und Stärkebouillon war nicht zu beobachten, und im Tierversuch erwies sich der Stamm als apathogen. Nach einer weiteren Speicheleinwirkung zeigte sich keinerlei Aenderung, auch traten bei etwa 35 bis 40 Weiterimpfungen auf den verschiedenen Diphtherienährböden niemals Rückschläge ein.

Intermedius.

Der Intermediusstamm 24 (Einzellkultur von Di. 11689) stammte von einem späteren Abstrich des gleichen Bacillenträgers, von dem der vorherbeschriebene Gravisstamm 13 isoliert war. Und zwar handelt es sich um den letzten Di-positive Abstrich, die nächsten drei Abstriche waren negativ. Der Stamm zeigte meist das typische farblose und zarte Intermediuswachstum. Die einzelnen Kolonien waren klein, etwas durchscheinend, und hatten einen unregelmäßig gezackten Rand (Abb. 3 I).

Säurebildung war nur in Traubenzuckerbouillon und zeitweilig auch in Dextrinbouillon zu beobachten, während Stärke nicht vergoren wurde. Das Wachstum im tiefen Agarstich war sehr schwach, die Tierpathogenität vorhanden. Die Ausbildung der Form schwankte stark, sowohl

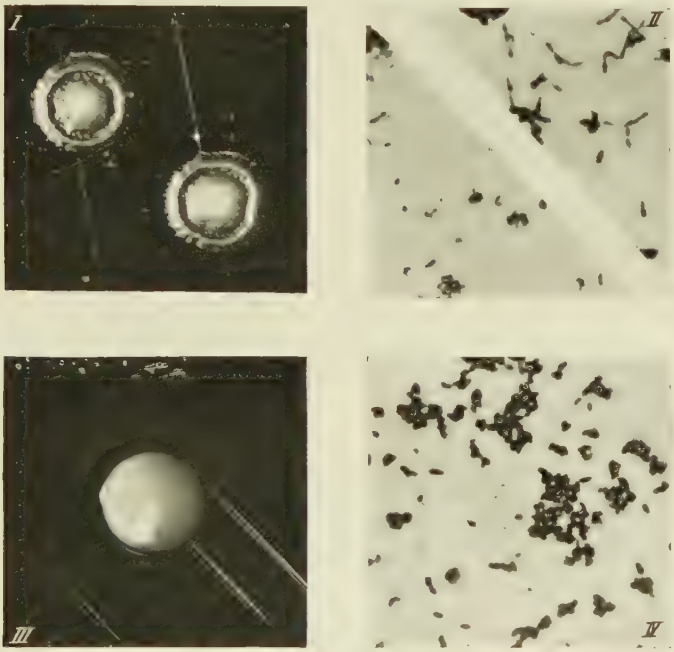

Abb. 3. Intermedius. Einzellkultur 24
I u. II Ursprungsstamm. III u. VI Umwandlungsstamm nach einer Speichelpassage
Fotografie wie bei Abb 1.

zeitlich auf einem und demselben, wie auch auf den verschiedenen Nährböden. Die Abb. 3 II zeigt zwei Mikrofotogramme, beide von 24 stünd. Löfflerserumkulturen. Zeitweise zeigte das Ausstrichpräparat ganz kurze, fast kokkenförmige Stäbchen, zeitweise dagegen, besonders bei Ausbildung schöner Einzellkolonien, mittellange bis lange keulen- und hantelförmige Stäbchen mit guter Neißerfärbung. Diese Formänderungen, die nicht zu den bisherigen Beschreibungen passen, die die Intermediusbacillen immer kurz und kokkenförmig schildern (Christison,

Gundel und Tietz u. a.) konnten auch bei anderen Intermediusstämmen, die in anderen Instituten isoliert waren, beobachtet werden. Tietz beschreibt in einer späteren Arbeit übrigens die lange keulige Stäbchenform als die einzige Intermediusform. Bereits nach einer einzigen Passage durch Speichel K. (Tab. 2) zeigte sich eine wesentliche Veränderung des Stammes. Die Uebertragung aus dem Speichel auf Clauberg II ergab nur einzelne lackschwarze Kolonien, Aussaaten von ihnen auf BCA wuchsen üppig in einem weißen, körnig schimmernden, glattrandigen Rasen und in großen weißen, glatten Einzellkolonien (Abb. 3 III). Im Ausstrichpräparat (Abb. 3 IV) sah man dicke, plumpe, spindelförmige, parallelgelagerte, grampositive Stäbchen ohne Polkörner. Bei den weiteren Untersuchungen ergab sich Apathogenität, fehlendes Wachstum im tiefen Agarstich und Fehlen der Säurebildung in Traubenzucker-, Stärke- und Dextrinbouillon. Neben der Wachstumshemmung war also hier eine völlige Umwandlung der überlebenden Keime eingetreten. Auch dieser abgewandelte Stamm zeigte bei der Weiterimpfung (etwa 20 mal) niemals irgendwelche Veränderungen.

Mitis.

Der Mitisstamm 33 (Einzellkultur von Di. 10708) stammte aus einer Schuluntersuchung auf Bacillenträger. Er zeigte auf BCA üppiges weißes, schleimiges Wachstum und große weiße Einzellkolonien mit glattem Rand und spiegelnder Oberfläche (Abb. 4 I). Im Ausstrichpräparat fand man lange, keulenförmige, etwas gekrümmte Stäbchen mit guter Färbbarkeit nach Gram und Neißer (Abb. 4 II). Der Stamm wies Säurebildung in Traubenzucker- und Dextrin-, nicht dagegen in Stärkebouillon, und anaerobes Wachstum im tiefen Agarstich auf. Er war für Meerschweinchen pathogen. Während die erste Speichelpassage an den Eigenschaften des Ursprungsstammes keinerlei Aenderung hervorrief, wurde nach der zweiten Passage die Form der Stäbchen kürzer und plumper, aber erst nach der dritten Speicheleinwirkung (St. 33c) trat die wesentliche Umwandlung ein. Der glattrandige weiße Rasen hatte eine etwas körnig schimmernde Oberfläche, die Einzellkolonien waren groß, weiß und hatten glatte Ränder, wiesen also kaum Unterschiede zu den Kolonien des Ursprungsstammes auf. (Abb. 4 III. Die Größenunterschiede in der Abbildung sind nur technisch bedingt).

Die Vergärung von Stärke, Dextrin und Traubenzucker aber, anaerobes Wachstum und Tierpathogenität waren nicht mehr vorhanden. Die stark grampositiven Bakterien waren kurz, plump und spindelförmig,

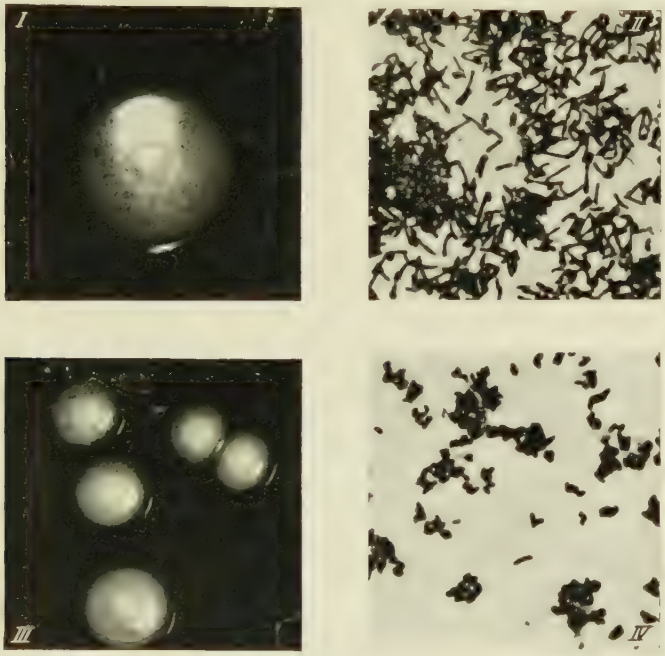

Abb. 4. Mitis. Einzellkultur 33
I u. II Ursprungsstamm. III u. VI Umwandlungsstamm nach einer Speichelpassage.
Fotografie wie bei Abb 1.

die Neißerfärbung war immer negativ. (Abb. 4 IV). Der so veränderte Stamm blieb über etwa 20 Weiterimpfungen in allen Eigenschaften konstant.

Abspaltungen.

Bei der ursprünglichen Versuchsanordnung (Aussaat aus dem bebrüteten Speichel zuerst auf Clauberg II und Abimpfung von einzelnen hier gewachsenen Kolonien auf BCA) schienen die Umwandlungen wie auch bei Dold und Weigmann im fließenden Uebergang vor sich

gegangen zu sein, derart, daß alle überlebenden Keime allmählich einen Teil ihrer ursprünglichen Eigenschaften verloren (Pathogenität, Traubenzuckervergärung, typische Stäbchenform u. a.) und andere erwarben. (gutes Wachstum auf ungünstigeren Nährböden, Spindelform u. a.) Als jedoch die Aussaaten sofort auf BCA aus dem beimpften und bebrüteten Speichel gemacht wurden, konnte man bei der Umwandlung des Gravisstammes 17 zum Intermediusartigen Stamm 17a beobachten, daß hier die Veränderung in Form einer Abspaltung vor sich ging. In einem Rasen von feinen zarten Kolonien (ähnlich dem Wachstum des Typus Intermedius) wuchsen einige schön ausgebildete große Kolonien mit allen Merkmalen des Ursprungstyps Gravis (Abb. 2 III). Beide Koloniearten bestanden aus neißerpositiven mittellang bis kurzen Di-Bacillen, beide Koloniearten ließen sich auch zunächst isolieren und rein weiterzüchten. Es befanden sich also hier sowohl überlebende Keime des Ursprungsstammes, wie auch bereits abgewandelte Keime in demselben Versuchsspeichel nach 40stünd. Bebrütung, nach 64stünd. Bebrütung dagegen waren nur noch abgewandelte Keime nachweisbar. Die Bakterien der Graviskolonien erwiesen sich auch in allen übrigen Merkmalen als Gravisbakterien, sie ließen sich auch ohne irgendeine Veränderung über viele Generationen (10) auf den gebräuchlichen Diphtherienährböden weiterzüchten. Bei der Weiterzüchtung der Bacillen der feinen Kolonien dagegen traten zeitweise auf optimalen Nährböden wieder zweierlei Kolonien auf, von denen sich die größeren wieder als Graviskolonien erwiesen und auch wieder rein weiterzüchtbar waren, während die zarten bei den nächsten Ueberimpfungen neuerdings Aufspaltungen zeigten, oder auch über eine Reihe von Generationen völlig rein weiterwuchsen. Eine ganz gleichartige Aufspaltung konnte nun auch bei der Einzellkultur 24 (Intermedius) beobachtet werden. Die Bakterien der Einzellkultur wuchsen sehr viele Generationen hindurch (etwa 2 Monate bei 2 bis 3 tägiger Uebertragung) auch bei wechselnden Nährböden völlig gleich und zeigten immer alle Eigenschaften des Typus Intermedius. Plötzlich traten dann ohne erkenntliche Ursache, aber immer auf besonders optimalen Nährböden (z.B. besonders dick gegossene BCA-Platte, oder eine Platte mit 2%igem Agar, 0,01 Cystin, 10% Hammelblut, 5% Hammelserum und 1% Traubenzucker oder Stärke in etwa 5 mm dicker Schicht ausgegossen)

Aufspaltungen auf. (Abb. 5 I). Dicht nebeneinander wuchsen, wie aus der Abbildung ersichtlich ist, neben kleinen zarten Kolonien vom Intermediustyp, große weiße, mehr oder weniger gezackte Kolonien, die sich

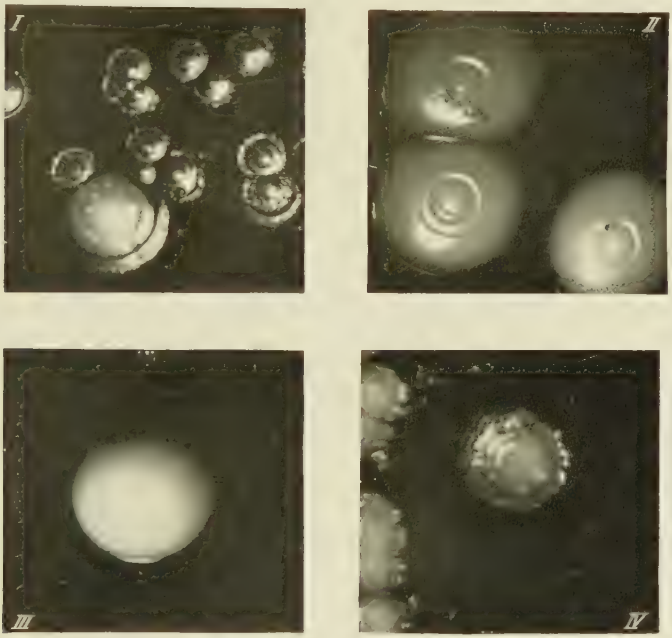

Abb. 5

I. Spontane Abspaltung von Kolonien des Typus Gravis bei der Einzellkultur 24 (Intermedius) II Pseudo Di-artiger Umwandlungsstamm aus dem Gravis 15. III Einzellkultur Ps2 von einem alten Laboratoriumsstamm vom Hoffmanntyp. IV rauher Abspaltungsstamm von Ps2 nach Speicheleinwirkung.

Fotografie wie bei Abb 1

rein weiterzüchten ließen und nach allen Eigenschaften dem Typus Gravis zuzuzählen waren. Die Intermediuskolonien zeigten bei der Weiterimpfung manchmal noch bei der zweiten und dritten Generation die gleiche Abspaltung von Graviskolonien und blieben dann wieder über längere Zeit konstant, bis dann wieder Abspaltungen auftraten. Zu diesen Zeiten war auch eine Säurebildung in Stärkebouillon (Intermedius vergärt nur Traubenzucker und Dextrin, keine Stärke) durch Bakterien der kleinen Intermediuskolonien zu beobachten,

die auch auf in der Bouillon abgespaltene Graviskeime zurückgeführt werden muß, da aus ihr beide Koloniearten herauszuzüchtet waren. Aehnliche Abspaltungen von Graviskolonien konnte man auch bei pseudodiphtherieartigen glatten Kolonien, die bei einer gleichzeitig mit diesen Versuchen laufenden Arbeit (Diss. H. Noeske) mit Speichelagar aus dem Stamm 13 gewonnen waren, beobachten.

Diese Beobachtungen erklären vielleicht auch einige Ergebnisse bei der Weiterzüchtung des früher beschriebenen intermediusartigen Abwandlungsstammes 15 d. Hier stellte sich nach der dritten Ueberimpfung auf BCA ein Rückschlag von der intermediusartigen Wachstumsform zum Ursprungstyp Gravis ein. Beim Zurückgehen auf die erste Clauberg II Platte und darauf folgender Weiterzüchtung dagegen konnten nach der vierten Passage über BCA nur noch in allen Eigenschaften pseudodiphtherieartige Bakterien wie bei Stamm 15e gefunden werden. Da zur Zeit der Versuchsreihen mit dem Stamm 15 noch keine Abspaltungsvorgänge beobachtet waren, und ein gleitender Uebergang aller Keime zu den Abwandlungsformen angenommen wurde, waren die Ueberimpfungen jedesmal vom Bakterienrasen gemacht worden, und bei den weiteren Uebertragungen nicht auf etwa auftretende kleinere Kolonien geachtet worden. So ist anzunehmen, daß in der Aussaat aus den Speichelproben sowohl intermedius- wie pseudodi-artige Umwandlungskeime vorhanden waren. Durch die Technik der Weiterzüchtung wurden dann einmal der wieder abgespaltene Gravis, und zum zweiten Male der im Rasen vorhandene Pseudotyp, die beide ein viel kräftigeres Wachstum zeigen als der intermediusartige Degenerationstyp, allmählich rein gezüchtet. Ganz ähnlich mag ebenfalls die Beobachtung zu erklären sein, daß der größte Teil der im Untersuchungsamt isolierten Intermediusstämme für unsere Untersuchungen nicht verwendbar waren, da sie meist nach einigen Ueberimpfungen ein kräftigeres Wachstum und deutliche Stärkevergärung zeigten.

Mit Ausnahme der zuletzt beschriebenen Stämme gelang die weitere Reinzüchtung bei ein bis zweitägigen Uebertragungen und ohne weitere Schädigung bei allen Stämmen, sowohl Ursprungsstämmen wie auch Abwandlungsstämmen, über lange Zeit (2 Monate), dabei ohne Aenderung irgendwelcher wesentlicher Eigenschaften (die Neißerfärbung

schwankte meist). Daß die umwandelnde Wirkung in diesen Fällen wirklich nur vom Speichel ausging, wird außerdem noch dadurch bewiesen, daß eine Umwandlung niemals in den mitlaufenden Kochsalz-Bouillon-Kontrollen zu beobachten war. Um aber in dieser Frage ganz sicher zu gehen, die NaCl-Bouillonkontrollen der Hauptversuche erstrekten sich ja nur auf den jeweils aus dem letzten Versuch herausgezüchteten Stamm, der unter Speicheleinwirkung gestanden hatte, wurde mit den Ursprungsstämmen ein von den Speicheleinwirkungsversuchen unabhängiger Kontrollversuch angestellt. Hierbei wurden die Stämme in der gleichen Aufschwemmung wie in den Hauptversuchen in 1 ccm NaCl-Bouillongemisch eingeimpft, nach 3 tägiger Bebrütung bei 37° auf die Claubergplatte ausgesät, von dem hier gewachsenen Rasen auf BCA übertragen und der so gewonnene Stamm auf seine übrigen Eigenschaften geprüft und dann wieder durch den gleichen Turnus geschickt. Nach einer sechsmaligen Passage durch diesen Turnus, der unter Fortfall der schädigenden Speichelwirkung sonst in allen Punkten dem Hauptversuch entsprach, war bei keinem einzigen der Stämme irgendeine Veränderung zu beobachten; nach einer derartigen Zahl von Speicheleinwirkungen dagegen waren bei allen verwendeten Ursprungsstämmen bereits lange die konstanten pseudodiphtherieartigen Varianten gebildet. Es muß also festgestellt werden, daß die **Umwandlungskraft im Speichel ausreichend** war um **alle** näher untersuchten **echten Diphtheriestämme** ausnahmslos und ohne Rücksicht auf ihre Typenzugehörigkeit **in** eine **konstante avirulente Variante zu verwandeln.** Diese ließ alle vier Haupteigenschaften vermissen, nach denen Neißer und Schmitz die „echten Diphtheriebacillen" von den „echten Pseudodiphtheriebacillen" trennen, nämlich außer der Tierpathogenität unterschiedlich lange und keulenförmige Stäbchen, Polkörnerbildung, Anaerobenwachstum und Traubenzuckervergärung. Auch ein erfahrener Untersucher hielt die abgewandelten Stämme ohne Zweifel für Pseudodiphtheriebacillen. Während sich nun aber die Typen Mitis und Intermedius direkt in pseudodi-artige Formen umwandelten, ging die Umwandlung des Typus Gravis über einen Zwischentyp, der nach allen Eigenschaften dem Typus Intermedius gleicht. Leider gelang es gerade bei dem Stamm 13 nicht, einen dem natürlichen Intermedius 24, der wie oben bemerkt aus dem gleichen Patienten stammt, analogen Degenerationsstamm zu gewinnen.

Eine Zusammenfassung aller Ergebnisse der Umwandlungsversuche gibt die folgende Tabelle 5

Tabelle 5

Stamm	Wachstum auf BCA	Form der Bakterien	Vergärung St.	Vergärung D.	Vergärung Tr.	Anaerobes Wachstum	Tierversuch pathogen
Urspr. 13	Gravis	mlang	+	+	+	+	+
3 Sp. p. 13c	Pseudo	kurz	0	0	0	0	0
Kontr. 13	Gravis	mlang	+	+	+	+	+
Urspr. 17	Gravis	mlang	+	+	+	+	+
1 Sp. p. 17a	Intermed.	kurz	0	+	+	?	+
4 Sp. p. 17d	Pseudo	kurz	0	0	0	0	0
Kontr. 17	Gravis	mlang	+	+	+	+	+
Urspr. 15	Gravis	mlang	+	+	+	+	+
4 Sp. p. 15d	Intermed.	kurz	0	+	+	?	+
5 Sp. p. 15e	Pseudo	kurz	0	0	0	0	0
Kontr. 15	Gravis	mlang	+	+	+	+	+
Urspr. 24	Intermed.	kurz lang	0	+	+	?	+
1 Sp. p. 24a	Pseudo	kurz	0	0	0	0	0
Kontr. 24	Intermed.	kurz	0	+	+	?	+
Urspr. 33	Mitis	lang	0	+	+	+	+
3 Sp. p. 33c	Pseudo	kurz	0	0	0	0	0
Kontr. 33	Mitis	lang	0	+	+	+	+

Zusammenstellung der Diphtheriestämme aus den Abwandlungsversuchen.
St.=Stärke, D. Dextrin, Tr.=Traubenzucker. Sp. p. Zahl der Speichelpassagen.
Kontr.=Stamm nach 6maliger Passage durch den Turnus des Kontrollversuchs.
mlang mittellang.

Nach diesen Versuchsergebnissen muß man naturgemäß erstens die Konstanz der Typen, zweitens die theoretische Begründbarkeit der strengen Trennung von „echten Löfflerbacillen“ und „echten Pseudodiphtheriebacillen“, zumindestens den im menschlichen Nasen-Rachenraum besonders bei Diphtherierekonvalenszenten vorkommenden, in Frage stellen. Es sind dies zwei Punkte, die zu den umstrittensten in der ganzen Diphtherieliteratur gehören.

Schon bei der Frage nach der Konstanz der Typen begegnet man recht verschiedenen Ansichten und Beobachtungen. Während Mc. Leod, Gundel und Tietz, und Bousson und Kowac für unbedingte Typenkonstanz in bakteriologischer und epidemiologischer Hinsicht eintreten und alle Ausnahmen für Misch- oder Superinfektionen erklären,

werten die anderen Autoren ihre Befunde nicht so bestimmt aus. Auch die anderen englischen Forscher glauben an eine gewisse Typenkonstanz, finden aber viele Uebergänge zwischen den Typen, sowohl bei dem gleichen Patienten wie auch bei Geschwisterinfektionen. Es werden auch zahlreiche atypische Stämme beschrieben. Schiff und Werber halten unter experimentellen Bedingungen ein Umschlagen der Typen nicht für ausgeschlossen, finden jedoch mit einer Ausnahme bei den einzelnen Patienten und bei Geschwistern konstante Typen. Hammerschmidt hält unter den üblichen Züchtungsmethoden eine gewisse Typenkostanz für gegeben, stellt aber fest, daß von seinen 50 neu untersuchten Di-Stämmen nur 12 reine Typen und zwar Intermedius darstellten, in den übrigen Abstrichen jedoch bis zu drei Typen gemischt vorhanden waren. Am häufigsten fand er Gravis und Intermedius gemischt, auch gelang es ihm meist aus Gravis-Einzellkulturen, seltener aus Mitis, Intermedius-Kolonien abzuspalten; nie sah er einen Uebergang zwischen Gravis und Mitis. Er hält daher Intermedius für eine Grundform und die anderen beiden Typen für Glatt-(S) und Rauh-(R) Formen (Arkwright), die durch unbekannte Komponenten mit der Grundform Intermedius gebildet werden. Clauberg, Helmreich und Vierthaler sehen bei einer Nachprüfung der Ergebnisse Hammerschmidt's gleichfalls auf dem auch von diesem verwendeten „Hungeragar" bei Einzellkulturen aller drei Typen Abspaltungen von drei Degenerationsformen, die in der Koloniebildung, nicht aber in den anderen biologischen Eigenschaften, völlig den drei Typen gleichen. Sie wollen aber eine scharfe Trennung dieser vom Nährbogen bedingten Varianten von den echten Typen aufrechterhalten wissen, da bei ihnen auf optimalen Nährböden die Variante regelmäßig zu ihrer Ursprungsform zurückzuführen war, die Typen jedoch auch dort konstant blieben. Auch Kliewe findet häufig Uebergänge zwischen seinen Typen. M. Christison beschreibt eine so große Menge von Stämmen, die zwar nach einigen Eigenschaften einem Typus zuzuzählen sind, andere wesentliche Eigenschaften des betreffenden Typs aber vermissen lassen, daß eine artmäßige Konstanz der Typen sehr in Frage gestellt erscheint. Auch hat sie Uebergänge eines Typs in den anderen beim Weiterzüchten beobachtet. Die meisten unklaren Fälle finden sich bei ihr auf der Linie Gravis-Intermedius.

Alle diese Beobachtungen aus der Literatur und den eigenen Versuchen bieten der schon nach der Definition des Typus Intermedius naheliegenden Ansicht eine Unterstützung, daß es sich bei diesem lediglich um eine noch virulente Degenerationsform des Typus Gravis handeln könnte, eine Möglichkeit, die auch Hetsche für gegeben hält. Weiter sprechen hierfür auch einige Fälle aus dem Untersuchungsamt der Berliner hygienischen Instituts, die Moser (Dissertation) beschreibt. Zwei Beobachtungsfälle, die in absoluter Parallele zu den beschriebenen experimentellen Ergebnissen stehen, will ich hier nochmals wiedergeben. Fünf Rachenabstriche des Bacillenträgers O.G. wiesen Di-Bacillen vom Typus Gravis auf (darunter St. 13). Der letzte positive Abstrich enthielt Di-Bacillen vom Typus Intermedius (St. 24), die nächsten drei Abstriche waren Di-negativ. Bei zwei Geschwistern fanden sich beim ersten Abstrich bei beiden Kindern Di-Bacillen vom Typus Gravis. Das erkrankte Kind blieb Gravis-positiv, im Abstrich des gesund bleibenden Kindes fanden sich bei der nächsten Einsendung nur Intermediusbacillen, die folgenden Abstriche waren dann Di-negativ. Der Ausnahmefall bei Schiff und Werber ist ebenfalls eine Geschwisterinfektion mit Gravis und Intermedius. Moser beobachtete außerdem, daß Patienten, die Intermediuspositiv waren, im Gegensatz zu den anderen Typen sehr bald, etwa nach höchstens 2 bis 3 Abstrichen Di-negativ wurden.

Auch die Beobachtungen Hammerschmidt's, die der Ansicht, daß es sich bei dem Typus Intermedius lediglich um eine Degenerationsform des Typus Gravis handele, scheinbar völlig entgegenstehen, lassen sich in Wirklichkeit sehr gut mit ihr vereinen, wenn man bedenkt, daß auch seine Versuchsanordnung der unseren genau entgegengesetzt ist. Während bei den beschriebenen Versuchen wie bei der Bearbeitung des natürlichen Infektionsfalles die Bakterien nach mehr oder minder kurzer Schädigung durch die Abwehrkräfte des Organismus oder seiner Sekrete auf möglichst optimalen Nährböden weitergezüchtet und beobachtet werden, bringt Hammerschmidt sie auf einen Hungernährboden und züchtet sie also unter weiterer Schädigung fort. So ist es völlig erklärlich, daß bei unserer Versuchsanordnung und bei den üblichen Bearbeitungsmethoden der Abstriche die kräftig wachsenden aber anspruchsvolleren

Formen konstant bleiben, wenn sie nicht weiter geschädigt werden, bei der Degenerationsform aber unter den günstigen Entwicklungsbedingungen Regenerationen (Abspaltung von Gravisколonien oder völliges Umschlagen zum Gravis) eintreten. Bei Hammerschmidt dagegen ist es natürlich, daß die Degenerationsform unter ungünstigen Wachstumsbedingungen (Hungerzustand) keine Regenerationen zeigt, also konstant bleibt, die Vollform dagegen teilweise degeneriert, also Intermediuskolonien abspaltet oder selbst ganz verloren gehen kann, sodaß nur noch Intermediuskolonien übrigbleiben. Dies wäre also, da man die Schädigung durch Speichel der durch Hungeragar gleichsetzen kann, die gleiche Umwandlung, wie bei den Stämmen 15=15b und 17=17a. Da diese Umwandlungen von Hammerschmidt ebenfalls bei Einzellkulturen gesehen wurden, könnte wohl auch hier von einer Konstanz der Typen in bakteriologischer Hinsicht nicht mehr gesprochen werden.

Wie man den Typus Mitis einzuordnen hat, ist schwieriger zu beurteilen. Die Differentialdiagnose zum Gravis ist im allgemeinen leicht zu stellen, auch ist die Mitisform am längsten einheitlich beschrieben. Es kann sich um eine dem Typus Gravis parallele Form handeln, deren einzige Verwandtschaft mit ihm in einzelnen Eigenschaften und in der gleichartigen Degeneration zum Pseudodi=Bacillus besteht, es kann sich aber auch um eine dem Intermedius gleich oder nachgeordnete Degenerationsform aus dem Gravis handeln; dies ist aber nicht wahrscheinlich, da Degenerationen des Gravis experimentell wie im Krankheitsfall häufig beobachtet sind, dabei aber niemals ein Uebergang zum Mitis mit allen biologischen Eigenschaften des Mitis gesehen wurde. Nach der Wachstumsform allein mitisartige Gravisdegenerationsstämme beschreiben Christison, Clauberg, Helmreich und Vierthaler. Auch im hiesigen Untersuchungsamt waren zwei Di=Stämme von Bacillenträgern zu differenzieren. Ihre Kolonieform blieb auch nach etwa 30 Uebertragungen auf den verschiedenen Nährböden immer glatt und schleimig. Da außer der Traubenzuckervergärung aber auch Stärkespaltung zu beobachten war, wurden die tierpathogenen Bakterien trotz ihres konstant glatten Wachstums (BCA) nicht als Mitiskeime angesehen.

Die dritte Möglichkeit, den Typus Mitis einzuordnen, die für mich am wahrscheinlichsten ist, ist die Annahme, daß es sich bei ihm um eine Regenerationsform aus dem Pseudodiphtheriebacillus handelt, die sich unter besonderen Umständen vielleicht zum giftigeren Gravis weiterentwickeln kann. Leider hat man es experimentell nur in der Hand, Di-Bacillen schädigenden Einflüssen zu unterziehen, es fehlen dagegen noch wirklich optimale Nährböden (vgl. die Versuchsergebnisse von Gins und Fortner) und die Kenntnis der zur Steigerung der Virulenz vielleicht noch notwendigen biologischen Reize (Disposition? Symbiose mit anderen pathogenen Bakterien s. h. Roux und Yersin?). Systematische Versuche in dieser Richtung wurden aber nicht angestellt, da sie nicht im Rahmen dieser Arbeit lagen. Jedenfalls steht der Typus Mitis dem Hoffmanntyp schon nach der Kolonieform sehr nahe und kann leicht mit ihm verwechselt werden (Tietz). Auf BCA lassen sich z. B. die beiden Typen kaum unterscheiden (vgl. Mitis Abb. 3 I, Pseudo-Abwandlungsstämme Abb. 1 III, 3 III, 4 III, 5 II., Hoffmannstamm Ps2 Abb. 5 III). Der Hoffmannbacillus wächst genau wie der Mitis in großen, weißen, glattrandigen Kolonien, eine zentrale Knopfbildung tritt bei älteren Kolonien ebenso wie bei älteren Mitiskolonien ein; allenfalls läßt sich insofern ein feiner Unterschied feststellen, als der Rasen bei Pseudo-Di auf BCA oft leicht körnig schimmert, und die Einzelkolonien häufiger eine glatte, aber blinde Oberfläche haben. Manchmal treten auch glattere, flache und mehr graue Kolonien auf, doch sind diese Unterschiede nicht immer zu beobachten, und auch sehr abhängig von dem Feuchtigkeitszustand und der Schichtdicke des Nährbodens. Auf dünner trockener Agarschicht wachsen Mitiskolonien ebenso. Auch bei den Pseudo-Di-Bacillen werden verschiedene typenartige Wuchsformen beschrieben (v. Riemsdijk, Hetsche), die aber auch nur Variationen einer Form (Kliewe) darzustellen scheinen. Wenigstens zeigten sich in einem Kontrollversuch mit dem Stamm Ps2 (Einzelkultur eines jahrelang im Laboratorium gehaltenen Hoffmannstammes) nach 64stündigem Aufenthalt in dem Speichelfiltrat K. auf dem 10% Blut-Serum-Cystin-Traubenzucker-Agar nach 48stündiger Bebrütung der Ausaat eine Aufspaltung in mehrere teils rein weiterzüchtbare, teils wieder aufspaltende Kolonieformen. Neben den weißen, glatten Kolonien der Ursprungsform, die nach 18std. Aufenthalt im Speichel in

der Aussaat noch einheitlich auftraten, sah man blinde, flache, graue, aber glatte Kolonien, einige unregelmäßig gezackte, rauhe und gelbliche Kolonien (Abb. 5 IV) und schließlich besonders blanke, weiße, glattrandige Kolonien, in denen sich lange, keulenförmige, neißerpositive Stäbchen fanden, die Traubenzucker spalteten. In den anderen Koloniesormen fanden sich in allen Eigenschaften typische Pseudostäbchen, nur die der rauhen Form zeigten zeitweilig schwache Traubenzuckervergärung. Entsprechende Beobachtungen machten Hetsche u. a., die besonders häufig auffallend viel verschiedene Formen von Diphtheroiden nebeneinander in Nasen- und Rekonvaleszentenabstrichen fanden, wo also eine besonders intensive antibakterielle Wirkung der Schleimhäute angenommen werden muß. Jedenfalls dürfte im praktischen Untersuchungsbetriebe eine Trennung z. B. des oben beschriebenen weißen, glänzenden Pseudodiphtherietyps von einem avirulenten Mitis kaum möglich sein, wenn man nicht eben diese Virulenz als wichtigstes Unterscheidungsmerkmal zwischen Hoffmann- und Löfflerbacillus ansieht. So mögen auch die unterschiedlichen Angaben in der Literatur über die Virulenz des Mitis zu erklären sein. Während nämlich Gundel u. a. fanden, daß alle Di-Bacillen einschließlich Mitis virulent waren, stellte Christison 40 avirulente Mitisstämme fest. Das Material beider aber stammte aus Berlin.

Hier berühren wir eines der umstrittensten Probleme der Bakteriologie der Diphtheriebacillen, nämlich die Frage, ob es sich bei den Löffler- und Pseudodi-Bacillen um zwei streng getrennte Arten, oder um zwei Erscheinungsformen des gleichen Bakteriums handelt. Es stehen sich seit der Entdeckung der beiden Formen schon die unicistische und die dualistische Anschauung gegenüber. Unicisten sind mit Roux, v. Behring, Schanz und Fränkel meist Forscher, die sich experimentell mit dem Diphtheriebacillus beschäftigen, überzeugte Dualisten sind Löffler, v. Hoffmann-Wellenhof und Neißer, und die meisten Autoren, die die Frage hauptsächlich vom rein praktischen und epidemiologischen Gesichtspunkt beleuchten. Auch Fränkel und mit ihm ein großer Teil der damaligen Unicisten gibt diesen Standpunkt nach der Entdeckung der Polkörnerfärbung durch Neißer, die, wie wir heute wissen, eines der unzuverlässigsten Merkmale der Löfflerbacillen ist,

und auf Grund von immunbiologischen Beobachtungen auf. Heute bestehen noch eine ganze Reihe von Autoren auf einer strengen Trennung der Arten, lehnen also die Möglichkeit einer Ueberführung „echter Löfflerbacillen“ in „echte Pseudodiphtheriebacillen“ ab, und geben die verschiedensten Methoden zur einwandfreien Trennung der Arten an. So glaubt z. B. Gins die vielen Uebergänge und Abwandlungen, die beschrieben sind, damit erklären zu können, daß sich die Formenkreise der beiden Arten weitgehend überschneiden, und meint, daß bei einiger Erfahrung eine sichere Differentialdiagnose zu stellen sei. Der wesentlichste Einwand gegen die unicistische Anschauung ist der, daß noch nie eindeutig ein echter Hoffmannbacillus in einen virulenten Löfflerbacillus umgewandelt worden ist. Dies dürfte jedoch wie gesagt mehr eine ungelöste technische Frage als ein grundsätzlicher Einwand sein. Kliewe, der in seinen Plus- und Minusvarianten sowohl vom Löffler-, wie vom Hoffmannbacillus her eigentlich fast alle denkbaren Formübergänge beschreibt, dabei aber aus praktischen Gründen für eine Artentrennung (serologisch) eintritt, hält in Analogie zu anderen saprophytisch-pathogenen Bakterien einen Uebergang für theoretisch möglich. Epidemiologische Einwände gegen die unicistische Anschauung (van Riemsdijk) kann man für die rein bakteriologisch-theoretische Klärung der Streitfrage nicht als stichhaltig ansehen. Es stützt sich die Auswertung der Untersuchungsamts-Ergebnisse ja eben auf die umstrittene Differentialdiagnose, andererseits ist die Erkrankungsstatistik bakteriologisch nicht auswertbar, da es ja auch avirulente echte Löfflerbacillen geben soll, und hochvirulente Bacillen bei gesunden Bacillenträgern gefunden werden. Auch die Typendifferenzierung hat keine epidemiologische Erklärung der verschieden schweren Erkrankungen geben können, da schwere Erkrankungen ja selbst Todesfälle durch Intermedius und Mitis beobachtet sind, und bei den 80% Gravisinfektionen sehr viel leichte Erkrankungen vorkommen und das Gravisbacillenträgertum garnicht selten ist. So muß man die schweren Erkrankungen wohl doch der für die Statistik des Löfflerbacillus nicht faßbaren Mischinfektion mit Streptokokken zuschreiben. Da die wesentlichste krankmachende Eigenschaft des Diphtheriebacillus die Toxinbildung ist, handelt es sich bei der praktischen bakteriologischen Differentialdiagnose gegen Pseudodi. lediglich darum, mit bestimmten Methoden ein Urteil darüber zu

gewinnen, ob es dem vorliegenden diphtheroiden Stamm zuzutrauen ist, daß er pathogen genug ist, um im menschlichen Rachen sofort, oder nach kurzer Regeneration das spezifische Toxin zu bilden, oder ob er bereits weit genug nach der saprophytischen Seite charakterisiert ist, daß die Toxinbildung nicht sobald zu erwarten ist. Bei dieser Auffassung ist auch die allgemeine Forderung Clauberg's, die Mitisbacillenträger nicht zu isolieren und als Di-negativ zu behandeln völlig verständlich. Mit der rein bakteriologischen Streitfrage zwischen Unicismus und Dualismus haben diese praktischen Erwägungen aber zunächst wenig zu tun. Hierzu ist nur festzustellen, daß sehr viele Eigenschaften der Bakterien angegeben worden sind, nach denen man sicher Löfflerbacillen, auch atypische, von Pseudodiphtheriebacillen trennen können soll, leider ist aber keine einzige Differenzialmethode so eindeutig und zuverlässig, daß sie allgemeine Anerkennung gefunden hat. Jeder Untersucher differenziert nach einer Eigenschaft, die ihm besonders wichtig und zuverlässig erscheint, und findet dann, daß alle anderen Methoden nicht unbedingt verläßlich sind. Diese Unmöglichkeit, wirklich sicher die beiden Arten zu trennen, und die Beobachtungen von Umwandlungen besonders von Löfflerbacillen zu Diphtheroiden und Pseudodiphtheriebacillen im infizierten Menschen und im Experiment sprechen mehr für die Ansicht, daß es sich nicht um streng getrennte Arten handelt. Schon Herlett und Knight wandelten echte Di-Bacillen durch einfaches Erhitzen, Roux und Yersin durch Bebrüten bei 39,5° in völlig pseudodi-artige Formen um. Bernhard erhielt durch Bebrüten bei 25° diphtheroide Formen, bei 37° dagegen echte Löfflerbacillen. Lewinthal fand im Kaninchenserum kurz vor der Abtötung aller Keime durch das Serum von den eingebrachten Einzellkulturen echter Löfflerbacillen nur noch echte Pseudodiphtheriebacillen vor. Bernhard und Paneth sahen Umwandlungen in diphtheroide Formen in Meerschweinchenblut und Serum, auch bei i. v. Injektion in den Tierkörper. Schmitz gewann nach Meerschweinchenpassage aus echten Löfflerbacillen Abwandlungsformen, die von echten Hoffmannbacillen nicht zu unterscheiden waren. Aehnliche Resultate sah er auch bei Röntgenbestrahlung von Löfflerbacillen. Killian fand weitgehende Umwandlungen bei seinen Fütterungsversuchen mit Diphtheriebacillen und Dold und Weigmann gelang es, Bakterien einer echten Löffler-einzellkultur durch

Schädigung auf Speichelagar über diphtheroide und unbeständige Formen in konstant fortzüchtbare Formen umzuwandeln, die sich in nichts von Hoffmannbacillen unterschieden und von ihnen für echte Pseudodiphtheriebacillen gehalten wurden. Mit diesen experimentellen Ergebnissen stehen gewisse Beobachtungen bei menschlichen Infektionen völlig in Einklang. Vielen Untersuchern fällt die häufige, beinahe regelmäßige Anwesenheit von Pseudodi-bacillen bei Diphtherierekonvaleszenten auf (v. Riemsdijk, Hettche u. a.), ebensoviel wird auf die Tatsache hingewiesen, daß besonders häufig atypische, degenerierte und pseudodi-artige Formen, zum Teil sogar nebeneinander (Hettche) in Nasenabstrichen und in Rachenabstrichen von Rekonvaleszenten und Bacillenträgern gefunden werden (Kliewe, Baerthlein, Schmitz, Bernhard und Paneth u. a.). Im Leichenblut und in Organen von an Diphtherie Gestorbenen fanden Frosch und Jakobsthal, im Harn Diphtheriekranker Gräf die gleichen Formen und Umwandlungen. Auch experimentell sahen Schmitz und Killian, daß die Umwandlungen besonders leicht bei sehr Diphtherieresistenten Tierarten und bei bereits geschädigten oder sonst atypischen Stämmen vor sich gingen. Alle diese Befunde sind so häufig und regelmäßig, daß Bernhard und Paneth die Fähigkeit, Diphtheriebacillen in die saprophytischen Pseudodiphtheriebacillen umzuwandeln, direkt mit den Genesungsvorgängen in Verbindung bringen, besonders, da sie auch in Nasenabstrichen von an Diphtherie Gestorbenen keine Umwandlungen fanden.

Es ist also anzunehmen, daß die unicistische Anschauung in Bezug auf Löfflerbacillen und die im menschlichen Körper saprophytisch lebenden Pseudodiphtheriebacillen im Recht ist, und daß man auch berechtigt ist, die bei den Speichelversuchen unter exakten, aber den natürlichen Verhältnissen weitgehend angepaßten Bedingungen aus den verschiedenen Typen von Löfflerbacillen hervorgegangenen Umwandlungsstämme, die sich in nichts von Hoffmannbacillen unterscheiden, für echte Pseudodiphtheriebacillen anzusehen, und die Vorgänge bei den Experimenten den Vorgängen im infizierten Organismus in Bezug auf die Löfflerbacillen für gleichartig zu halten.

Zusammenfassung.

Es werden die Versuchsergebnisse von Dold und Weigmann bestätigt und ihre Problemstellung auf das Problem der drei Diphtherietypen erweitert.

Der menschliche Speichel hat eine antibakterielle Wirkung auf die Diphtheriebacillen, die aber nicht bei allen Personen vorhanden und gleich stark ist, und deren Stärke auch bei den einzelnen Personen zeitliche Schwankungen zeigt. Die antibakterielle Kraft ist einmal imstande, das Wachstum von Diphtheriebacillen ohne Unterschied der Typen gegebenenfalls bis zum Absterben zu hemmen, zweitens alle drei Typen von Löfflerbacillen über atypische Formen, oder einen anderen Typ in eine Form umzuwandeln, die von dem saprophytischen echten Pseudodiphtheriebacillus nicht zu unterscheiden ist.

Anderson, Happold, Mc. Leod, Thomson J. of Path. 1931 Nr. 34
Baerthlein Zbl. Bakt. I Ref. 57 Beih. 89 1913
„ „ I Orig. 81, 430 1918
Bernhard Z. Hyg. 79, 179 1915
Bernhard und Paneth Zbl. Bakt I Ref. Beih. 83 1913
M. Bordet zit. n. Dold und Weigmann
H. Braun Fortschr. d. Medizin 1916/17
Brückner Z. Hyg. 116, 361 1934
Busson - Kowac Zbl. Bakt. II Ref. 118, 555 1935
H. M. Christison „ „ I Orig. 133, 59 1934
Clauberg M. m. Wschr. 1935 I, 945
Zbl. Bakt. I Orig. 134, 96 1934
Clauberg, Helmreich, Vierthaler Klin. Wschr. 1936 I, 231
Dold und Weigmann Z. Hyg. 116, 158 1934
C. Fränkel Berl. Klin. Wschr. 1893 I, 252
„ „ „ 1897 II, 1087
Gundel und Tietz Z. Hyg. 116, 439 1934
Gundel Z. Hyg. 117, 66 1934
Gräf Zbl. Bakt I Ref 57 Beih. 78 1913
H. A. Gins Handbuch der path Mikroorg. Bd. 5, 451
Gins und Fortner Zbl. Bakt. I Orig. 99, 243 1925
Hammerschmidt Zbl. Bakt. I Orig. 93, 443 1924
D. m. Wschr. 1924 II, 1831
Klin. Wschr. 1934 I, 964
Zbl. Bakt. II Ref. 118, 555 1935
Herlett und Knight zit. n. Bernhard und Paneth
H. O. Hettche Z. Hyg. 117, 33 1934
Klin Wschr. 1935 I, 88
Zbl. Bakt. I Orig. 134, 421 1935
v. Hoffmann-Wellenhof Wiener m. Wschr. 1888 Nr. 3/4
Jakobsthal Zbl. Bakt. II Ref. 54 Beih. 45 1913
Killian Z. Hyg. 102, 262 1924
Kliewe Zbl. Bakt. I Orig 101, 6, 44, 199 1927
Koblmüller und Vierthaler Zbl. Bakt. I Orig. 129, 438 1933
Lewinthal Z. Hyg. 106, 679 1926
Löffler Zbl. Bakt. Bd. II, 105
M. Neißer Zbl. Bakt I Ref. 57 Beih. 6 1913
Z. Hyg. 24, 443
Pesch Zbl. Bakt. I Orig. 92, 312 1924
van Riemsdijk Zbl Bakt. I Orig. 75, 202, 229 1925
Roux und Yersin Ann. Inst. Pasteur 1890, 385
Sanarelli und Florain, Hugenschmidt, van der Reis, Krüger
zit. n. Dold und Weigmann
Seitz Bakteriologie für Zahnärzte 1930
Schanz Berl. Klin. Wschr. 1896 Nr. 12
„ „ „ 1897 Nr. 2
Schiff und Werber D. m. Wschr. 1935 I, 259
K. E. F. Schmitz Zbl. Bakt. I Orig. 77, 369 1916
Berl. Klin. Wschr. 1917 Nr. 6
Zbl. Bak. I Orig. 83 1919
Z. Hyg. 104, 527 1925
Tietz D. M. Wschr. 1935 I, 834
L. Zupnik Berl. Klin. Wschr. 1897, 1085

Lebenslauf.

Am 8. August 1911 wurde ich in Königsberg i. Pr. als Sohn des Oberfinanzrats Ernst Koehn geboren. In Königsberg besuchte ich das Altstädtische-Gymnasium, von 1924 ab das Arndt-Gymnasium in Berlin-Dahlem. Hier bestand ich Ostern 1929 die Reifeprüfung. Danach studierte ich an den Universitäten in Berlin und Freiburg i. B. Medizin. Am 4. November 1933 bestand ich in Berlin die ärztliche Vorprüfung mit dem Gesamturteil „Gut", am 5. Februar 1937 gleichfalls in Berlin das ärztliche Staatsexamen mit dem Urteil „Sehr gut". Meine Bestallung als Arzt erhielt ich am 1. März 1938.